



Središnja medicinska knjižnica

Krebs, Bojan (2014) *Primjena sinbiotika u prijeoperacijskoj pripremi bolesnika za elektivnu operaciju debelog crijeva [Synbiotics application in the preoperative preparation of patients for elective colorectal cancer surgery]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/2104>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Bojan Krebs

Primjena sinbiotika u prijeoperacijskoj
pripremi bolesnika za elektivnu operaciju
debeloga crijeva

DISERTACIJA



Zagreb, 2014.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Bojan Krebs

Primjena sinbiotika u prijeoperacijskoj
pripremi bolesnika za elektivnu operaciju
debeloga crijeva

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena na Odjelu za abdominalnu kirurgiju Univerzitetnog kliničkog centra Maribor, Slovenija.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Željko Krznarić

UVOD	1
POSTOPERATIVNA UPALA	2
BAKTERIJSKA TRANSLOKACIJA	3
MEHANIČKO ČIŠĆENJE CRIJEVA	5
PROBIOTICI	7
PREBIOTICI	12
SINBIOTICI	19
LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE	19
HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
MATERIJALI I METODE	24
REZULTATI	31
RASPRAVA	37
ZAKLJUČCI	44
SAŽETAK	46
SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU	48
LITERATURA	50
ŽIVOTOPIS	63

POPIS OZNAKA I SKRAĆENICA

ASA – Američko udruženje anesteziologa(*American Society of Anesthesiologists*)

CFU – jedinice koje tvore kolonije(*engl. Colony forming unit*)

CRP – C reaktivni protein

IL-1 – Interleukin 1

IL-6 – Interleukin 6

LAB – Bakterije mliječne kiseline(*engl. Lactic acid bacteria*)

PCR – Lančana reakcija polimeraze(*engl. Polymerase chain reaction*)

TNF – Tumor nekrotizirajući faktor

1 UVOD

Usprkos napretku u medicini, a osobito onkologiji i kirurgiji, u posljednjih nekoliko desetljeća stopa preživljavanja i broj komplikacija, nakon operacija debelog crijeva zbog maligne bolesti, nisu se značajno mijenjale(1).

POSTOPERATIVNA UPALA

Jedna od važnih postoperativnih komplikacija je bez sumnje postoperativna upala koja može ponekad voditi i do sepse. Unatoč širokoj uporabi profilaktičkih antibiotika, infekcije su još uvijek vrlo važan razlog postoperativnog morbiditeta, koji dovodi do produljenog boravka u bolnici, povećanih troškova, pa čak i veće smrtnosti(2).

Postoperativna upala je po svojim karakteristikama slična svakoj drugoj upali u organizmu. Kada dođe do povrede tkiva, bilo traumom, kao što je slučaj u kirurgiji, bilo bakterijama ili nekim drugim uzrokom, tada dolazi do otpuštanja brojnih supstancija iz oštećenog tkiva, koje uzrokuju sekundarne promjene u okolnom neoštećenom tkivu. Taj kompleks promjena u tkivima zove se upala(3). Sustavne promjene povezane sa akutnom upalom zajedno nazivamo odgovor akutne faze ili sindrom sustavog upalnog odgovora(4). Odgovor akutne faze je generalizirana reakcija, bez obzira na to da li je oštećenje koje ga je izazvalo sistemsko ili lokalizirano. To pokazatelje ove reakcije čini dobrim indikatorima bolesti. Kaskadu događaja započinju aktivirani makrofagi i monociti, koji otpuštaju široki spektar citokina, čiji učinak je prije svega sistemski ali i lokalni. Središnju ulogu u pokretanju odgovora akutne faze imaju citokini TNF, IL-1 i IL-6, koji lokalno dovode do aktivacije parenhimskih i endotelних stanica, otpuštanja kemotaktičnih peptida i migracije granulocita u oštećeno tkivo.

Odgovor akutne faze se sastoji od različitih sistemskih i patoloških promjena:

- Povišena tjelesna temperatura
- Leukocitoza – česta značajka upalnih reakcija, posebno onih koje su uzrokovane bakterijskom upalom. Broj leukocita obično poraste do $20 \times 10^9/L$ a iznimno može i do $40 \times 10^9/L$. Većina bakterijskih upala dovodi do povišenja relativnog broja neutrofila
- Povećanje koncentracije proteina akutne faze, to su proteini plazme, sintetizirani u jetri, čija se koncentracija može povećati više stotina puta kao dio odgovora akutne faze. Tri takva najpoznatija proteina su: C – reaktivni protein(CRP), fibrinogen i serumski amiloid A protein. Sintezu tih molekula u jetri kontroliraju citokini: interleukin 6(IL-6) je odgovoran za sintezu CRP-a i fibrinogena, a interleukin 1(IL-1) i tumor nekrotizirajući faktor(TNF) za sintezu serumskog amiloida A. Neki proteini akutne faze, poput CRP-a, se vežu na stanične zidove mikroba te mogu djelovati kao opsonini u reakciji komplementa. Fibrinogen se veže na eritrocite i uzrokuje formiranje skupina(rouleaux), koje sedimentiraju brže nego pojedini eritrociti. To je osnova za mjerenje sedimentacija eritrocita, jednostavnog testa za sustavni upalni odgovor bilo kojeg uzroka.

BAKTERIJSKA TRANSLOKACIJA

Točan patofiziološki mehanizam, zbog kojeg za vrijeme i nakon velikih operativnih zahvata dolazi do bakterijske upale, nije poznat. Međutim, vjeruje se da je od velike važnosti za patogenezu takvoga stanja bakterijska translokacija iz probavnog trakta u sustavnu cirkulaciju(5-8).

U posljednje vrijeme sve se više zna o tome da probavni trakt ima i druge funkcije, a ne samo funkciju probave i izlučivanja hrane. Crijevo je osim toga, zajedno sa crijevnom stijenkom,

metabolički i imunološki organ koji služi kao barijera protiv živih organizama i antigena koji se nalaze u lumenu. Koliko je ta barijera učinkovita, govori činjenica da je u slijepom crijevu koncentracija mikroorganizama reda 10^{12} /mL, dok su mezenterični limfni čvorovi i krv u veni porte obično sterilni(9).

Ipak, može se dogoditi da je u određenim uvjetima ta barijera insuficijentna te tada dolazi do bakterijske translokacije. Izraz bakterijska translokacija su definirali Berg i Garlington već 1979 godine(10). Bakterijska translokacija je proces kod kojeg bakterije iz crijeva prelaze sluzničnu barijeru i dolaze u mezenterijalne limfne čvorove iz kojih se kasnije mogu proširiti u sistemsku cirkulaciju i prouzrokovati sepsu. Termin se također odnosi na prolaz inertnih čestica i drugih makromolekula, kao što su lipopolisaharidni endotoksini, preko crijevne barijere.

Nema dakle sumnje da kod čovjeka u određenim okolnostima može doći do bakterijske translokacije(10,11). Prevalencija bakterijske translokacije je kod elektivnih kirurških zahvata oko 15%, a češća je kod bolesnika sa intestinalnom opstrukcijom, imunokompromitiranih bolesnika, kod donora organa, kod bolesnika s karcinomom debelog crijeva te pankreatitisom. Postoje dokazi da je translokacija povezana s povišenom incidencijom septičkih komplikacija ali ne i većom smrtnošću(12). Postoji i više istraživanja koja su pokazala povezanost gastrointestinalne mikroflore i nozokomijalnih upala, međutim ne postoje čvrsti dokazi da je uzrok takvih upala definitivno bakterijska translokacija. Do sada je provedena samo jedna klinička studija koja pruža uvjerljive dokaze o direktnoj povezanosti translokacije i razvoja kasne sepse(13).

Glavni uzrok bakterijske translokacije kod elektivnih zahvata je ozljeda sluznice debelog crijeva, koja dovodi do poremećaja crijevne barijere i povećane propusnosti crijeva, kao i mikrobiološka neravnoteža i imunodeficijencija kod bolesnika nakon velike operacije(14-16).

Takvi bolesnici imaju više faktora rizika za promjenu crijevne mikroflore, koja može dovesti do translokacije patogenih bakterija u lokalne limfne čvorove, krv i druge organe:

- smanjen postoperativni crijevni motilitet,
- žutica,
- preoperativna aplikacija antibiotika i preoperativno mehaničko čišćenje,
- gubitak funkcije mukozne barijere zbog pothranjenosti(preoperativno čišćenje i gladovanje nakon operacije),
- intraoperativna manipulacija crijeva,
- parenteralna prehrana,
- depresija imunološkog sustava zbog transfuzije krvnih pripravaka
- operativna trauma(17-23).

MEHANIČKO ČIŠĆENJE CRIJEVA

Mehaničko čišćenje crijeva prije većih abdominalnih operacija prakticira se gotovo od početka ove vrste kirurgije, dakle više od 100 godina(24-25). Vjeruje se da značajnu ulogu u tom pristupu ima tradicija. Obrazloženje se temelji na hipotezi da stolica i bakterije u području kirurškog rada mogu pogodovati razvoju upale(26). Ideja je da se uklanjanjem gastrointestinalnog sadržaja, odnosno mehaničkim čišćenjem prije operacije, smanjuje bakterijski sadržaj i na taj način smanjuje rizik od rane infekcije, kasnih septičkih komplikacija, trbušnih apscesa, pa čak i dehiscencija anastomoza. Kliničko iskustvo i neke studije u dvadesetom stoljeću su uspjele dokazati da preoperativno čišćenje smanjuje morbiditet i mortalitet i stoga su se preporuke temeljile na tim spoznajama(27, 28).

Međutim, u posljednje vrijeme smo došli do spoznaja da mehaničko čišćenje crijeva ima vrlo jak, prije svega negativan učinak na crijevnu floru koja je važna za razgradnju biljnih vlakana i upotrebu produkata razgradnje kao što su aminokiseline, masne kiseline, poliamini, vitamini i antioksidansi, faktori koagulacije i faktori rasta. Crijevena flora i imunološke stanice istovremeno su i snažan izvor proupalnih i protuupalnih citokina te izravno sudjeluju u prevenciji upale, cijeljenju anastomoza i mnogim drugim metaboličkim zbivanjima u organizmu. Čak i cijeljenje crijevnih anastomoza ovisi o intraluminalnoj proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina, posebice butirata koji se oslobađa kod bakterijske fermentacije biljnih vlakana u crijevu. Svi ti važni procesi u crijevu su kod mehaničkog čišćenja crijeva djelomično ili potpuno blokirani(29).

Jedno od prvih istraživanja, koje je pokušalo objasniti štetne učinke mehaničkog čišćenja te dokazati da kirurgija debelog crijeva može biti sigurna i bez čišćenja, objavljeno je još 1987. godine. Rezultati istraživanja su pokazali kako stopa dehiscencije anastomoza nije bila viša kod bolesnika koji nisu bili čišćeni(30). Do danas je objavljeno više različitih istraživanja i meta-analiza čiji rezultati pokazuju kako ne postoji značajna korist od preoperativnog čišćenja(31-34).

Rezultati Cochraneove meta-analize, objavljene 2011. godine, u koju je bilo uključeno 18 studija sa ukupno 5805 bolesnika, su pokazali kako nema statističko značajnih dokaza o koristi mehaničkog preoperativnog čišćenja, te da se u kirurgiji debelog crijeva može izostaviti preoperativno mehaničkosko čišćenje, čime bolesnici ne bi bili izloženi višoj stopi komplikacija(35).

Usprkos svim tim dokazima, preoperativno mehaničko čišćenje se još uvijek široko primjenjuje. Kako pokazuju istraživanja u Americi i Španjolskoj, kod velike većine bolesnika prije operacije debelog crijeva, primjenjuje se mehaničko preoperativno čišćenje(36-37).

Uzimajući u obzir da su rezultati istraživanja pokazali kako preoperativno čišćenje crijeva nema koristi te da čišćenje čak može biti i štetno, a opasnost se vjerojatno odnosi na promjene u količini i sastavu bakterija u debelom crijevu, koje nastaju takvim postupcima, bilo bi potrebno pronaći postupke kojima bi uspjeli očuvati prirodan sastav bakterija u debelom crijevu prije, za vrijeme i poslije velikih zahvata te time očuvati i njihove pozitivne učinke. Jedna od mogućnosti je potpuno izbjegavanje mehaničkog čišćenja crijeva prije operacije, a nakon operativnog zahvata što prije započeti s enteralnim hranjenjem bolesnika. Na taj način pokušavamo smanjiti naš utjecaj na crijevnu floru prije operacije. Takav pristup, uz neke druge postupke, nazivamo „fast-track“ kirurgija, a poznat je i kao koncept multimodalne, odnosno ubrzane rehabilitacije nakon kirurških zahvata (ERAS=enhanced recovery after surgery). Razlika između konvencionalne i „fast track“ kirurgije u preoperativnom tijeku je prije svega u izbjegavanju preoperativnog gladovanja i naravno preoperativnog čišćenja crijeva. Na taj način se očuva normalna crijeva flora. Do sada je objavljeno više istraživanja koja su pokazala pozitivan učinak takvih mjera(38).

PROBIOTICI

Bogata i zdrava crijeva flora je vrlo važna u svakodnevnom održavanju homeostaze. Različite funkcije crijevne flore još nisu dovoljno istražene ali je jasno da govorimo o velikom i vrlo kompliciranom sustavu. Broj mikroorganizama u tijelu je 10 – 20 puta veći nego što je broj eukariotičnih stanica. Još impresivniji je podatak da flora debelog crijeva sadrži otprilike 2 milijuna gena, dok je svih ostalih eukariotičnih gena u ljudskome tijelu samo oko 30 000. Starost, spol, cirkadijani ritam, tjelesna temperatura, lijekovi, hrana koju konzumiramo, pa i bolest ili stres koji predstavlja operacija, sve to utječe na važne funkcije u ljudskom organizmu kao što su hemostaza, funkcija endotela, metabolizam glukoze i masti,

kapilarna propusnost, funkcija limfocita i produkcija imunoglobulina te samim time utječe i na rezistenciju na bolest. U svim tim procesima crijevo igra važnu ulogu.

Dugo vremena se vjerovalo da se urođeni imunološki sustav nalazi samo u koštanoj srži, slezeni i limfnim čvorovima. Međutim u posljednjih 20 godina postalo je jasno da je glavni organ za taj važan obrambeni sustav crijevo. Nije tako dobro poznato, da je otprilike 70 % stanica koje proizvode imunoglobuline, smješteno u lamini propriji crijeva, dakle u gastrointestinalnom traktu(39). Neke kronične bolesti, ali i akutna stanja, mogu biti izravno povezane ili su posljedica oslabljenog urođenog imunološkog sustava. Urođeni ili prirodni imunološki sustav, koji je filogenetski puno stariji od stečenog imunološkog sustava, predstavlja prvu liniju obrane od nekog vanjskog stimulusa, što je vrlo slično odgovoru akutne faze. Glavna zadaća urođenog imunološkog sustava i odgovora akutne faze je što brža eliminacija stresora i ponovo uspostavljanje homeostaze. Pri tom su glavno oruđe već ranije spomenuti proteini akutne faze, CRP i fibrinogen, čija je produkcija kontrolirana i stimulirana ispuštanjem citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF.

Sama probava u crijevu se odvija pomoću dva različita mehanizma. Najbolje je istražen sustav digestije, koji se temelji na učinku enzima koji se nalaze u gastrointestinalnim sokovima duž cijelog probavnog trakta, a njihova ukupna sekrecija iznosi i do 10 litara dnevno. Ta sekrecija je jako važna za samu probavu jer sekreti probavnog sustava sadrže osim enzima i cijeli niz čimbenika, kao što su imunoglobulini, laktoferin, lizosomi i fibronektin, koji su potrebni za imunološki sustav i kontrolu upale. Uz to u sekretima probavne cijevi nalazi se i mucin, koji služi kao matriks i zaštita za sluznicu, ali i kao supstrat za fermentaciju te hrana za bakterije. Zato je vrlo važno da kod bolesnika za vrijeme operacije tu sekreciju stimuliramo, a ne inhibiramo, kao što je često primjer kod takvih bolesnika.

Drugi važan čimbenik u ljudskoj probavi, puno manje istražen, predstavlja 1 – 2 kilograma mikroorganizama, koji se nalaze u probavnom traktu, prije svega u debelom crijevu. Čini ga

više od 400 mikrobnih vrsta sa gustoćom 10^{14} . Ipak, oko 99% te mase predstavlja samo 30 do 40 mikrobnih vrsta(40). Glavni rodovi(genera), koji su otkriveni u crijevnoj flori čovjeka su *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* i *Escherichia*.

Upala je usprkos prisutnosti više milijardi mikroorganizama relativno rijetka u debelom crijevu, što se može objasniti činjenicom da komensalna flora ima sposobnost indukcije B i T limfocita i to bez pokretanja mehanizma upale tipične za patogenu infekciju.

Svaki čovjek ima vlastite jedinstvene sojeve bakterija u debelom crijevu posebno što se tiče bifidobakterija i laktobacila(40). Flora se formira u ranim godinama razvoja, a nove vrste kasnije više ne mogu trajno kolonizirati crijevo. Bakterije koje dodajemo kasnije u životu ostati će u flori najviše nekoliko dana.

Mikroorganizmi iz zdrave ljudske flore razgrađuju pre svega hranu koja stiže u debelo crijevo neobrađena, odnosno hranu koja se ne može razgraditi enzimima iz gastrointestinalnih sekreta. Na taj način se dobiva energija iz inače neprobavljivih ugljikohidrata. U tu hranu uglavnom spada svježe voće i povrće te neobrađene žitarice. Za tu hranu se koristi i izraz hrana za debelo crijevo – „colonic food“. Mikroorganizmi koji uspijevaju razgraditi te ugljikohidrate, istovremeno kontroliraju i različite patogene mikroorganizme, koji se natječu s njima za isti izvor energije. Crijevna sluznica je visoko prilagođena za takve komensale. Imunoglobulini A, koji se izlučuju u prisutnosti tih bakterija sačinjavaju više od 70 % ukupne tjelesne proizvodnje imunoglobulina(41).

Različiti mikroorganizmi o debelom crijevu žive zajedno u simbiozi s domaćinom i imaju povoljan učinak na organizam domaćina. Ti organizmi, koji sami po sebi imaju vrlo slab metabolički učinak, rade u međusobnoj sinergiji i osiguravaju hranu za sebe i za domaćina. Vrlo je vjerojatno da se velika količina različitih hranidbenih tvari, vitamina i antioksidanata otpušta i razgrađuje kao rezultat djelovanja mikrobnih enzima u debelom crijevu. Uz to, ti

mikroorganizmi predstavljaju prvu liniju odbrane protiv vanjskih patogena ili unutarnjih oportunističkih mikroorganizama(42).

Poznato je da svi mikroorganizmi nisu sposobni fermentirati biljna vlakna. Među onima koji to mogu su u prvom redu različiti sojevi laktobacila, koji su posebno dominantni među populacijom koja već od početka uživa veću količinu hrane bogate biljnim vlaknima. Naši preci su konzumirali više od 500 različitih biljnih tvari, a osim toga ta hrana je često bila kontaminirana zemljom, koja je bogat izvor različitih mikroorganizama(43). Moderan način života s novim načinom prehrane nije povoljan za bogatu i raznoliku floru u probavnom traktu. Više studija je dokazalo razliku u crijevnoj flori među populacijama koje uživaju hranu bogatu fermentiranim biljnim vlaknima i onih koji se prehranjuju takozvanim zapadnim načinom prehranjivanja(44-47).

Najekstremniji primjer je flora astronauta koji su po povratku iz svemira izgubili većinu svoje komensalne flore, uključujući laktobacile(48). Te promjene su s jedne strane vjerojatno posljedica posebnog načina prehrane koja nije sadržavala svježe voće i povrće, a s druge strane i posljedica promijenjenog načina života, koji uključuje mentalni i fizički stres i manju fizičku aktivnost. Nema dvojbe da danas većina zapadne populacije živi sličan način života s visokim stupnjem stresa i sa smanjenom fizičkom aktivnošću.

S jedne strane smo već pokazali da preoperativno čišćenje može smanjiti broj bakterija i narušiti već ionako labilnu ravnotežu mikroorganizama u debelom crijevu, a s druge strane možemo pretpostaviti da bi povećanje broja tih istih ili sličnih bakterija moglo imati povoljan učinak na organizam, u smislu sprječavanja rasta potencijalno patogenih mikroorganizama i njihovog prerastanja(49-50).

Dakle, postoji mogućnost da bi dodavanjem takozvanih "dobrih bakterija" teškim bolesnicima i bolesnicima prije i nakon većeg kirurškog zahvata mogli spriječiti bujanje patogenih bakterija i sve posljedice koje takvo bujanje izaziva. Takve "dobre bakterije" nazivaju se

probiotici. Riječ probiotik znači »za život«, a po definiciji je to preparat živih mikroorganizama koji mijenja mikrofloru u crijevu i ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. U povijesti se definicija mijenjala i polako razvijala do današnje. Koncept dodavanja mikroorganizama u svrhu povoljnog djelovanja na organizam prvi je opisao već početkom 20. stoljeća Ilja Mečnikov, ruski znanstvenik, koji je dobio Nobelovu nagradu za svoj inovativni rad na području imunologije. Međutim definicija se počela razvijati tek u šezdesetim godinama 20. stoljeća. Prva objava iz 1965. godine tvrdi da su probiotici tvari koje produciraju mikroorganizmi i koje potiču rast drugih mikroorganizama(51). Slijedeću definiciju postavio je Parker 1974. godine: Probiotici su organizmi i tvari, koji doprinose intestinalnoj ravnoteži mikroorganizama(52). 1989. godine objavljena je tvrdnja da su probiotici dodatak hrani iz živih mikroorganizama koji pozitivno utječu na domaćina poboljšanjem crijevne mikrobne ravnoteže(53). Definicija koja je slična današnjoj definiciji, objavljena je 1992. godine a govori da je probiotik živa kultura jednog ili više mikroorganizama, koja primijenjena na životinji ili čovjeku blagotvorno utječe na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore(54). Po Schaafsma, 1996, probiotici su živi mikroorganizmi koji, nakon ingestije u određenoj količini imaju zdravstvenu dobrobit za domaćina(55). Definicija iz 2001. tvrdi da su probiotici pripravci ili proizvodi koji sadrže žive mikroorganizme u dovoljnom broju da mijenjaju mikrofloru(implantacijom ili kolonizacijom) u domaćinu i da imaju povoljan učinak na zdravlje tog domaćina(56).

Konačno, stručnjaci Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda(FAO / WHO) definirali su probiotike kao žive mikroorganizme koji, kada se primjenjuju u odgovarajućim količinama, povoljno utječu na domaćina(57).

Postoji još nekoliko uvjeta koji moraju biti ispunjeni da bi mogli govoriti o probioticima.

- Probiotici moraju biti živi. Iako je dokazano, da i mrtvi mikroorganizmi mogu imati povoljan učinak na domaćina, za mrtve mikroorganizme treba upotrijebiti drugi naziv.

- Probiotici moraju biti pripremljeni. Istina je da se crijevna flora može izolirati i uzgajati te kasnije upotrijebiti kao probiotik, ali taj naziv za takvu floru nije ispravan.
- Probiotici moraju imati izmjerivu korist za zdravlje, potkrijepljenu relevantnim studijama(58).

Vrlo je važno da probiotici koji se koriste ostaju živi tijekom gastrointestinalnog prolaza i da najmanje 10^7 CFU / ml živih bakterija stigne do debelog crijeva(59). CFU(colony forming unit) je mjera za broj živih bakterija. Za razliku od izravnih mikroskopskih brojanja gdje se broje sve stanice, mrtve i žive, CFU mjeri samo žive stanice. Samo na taj način možemo očekivati klinički učinak unesenih probiotika. Većina probiotika koji se reklamiraju i prodaju ne ispunjava ovaj uvjet. Naime, sposobnost da opstane pod djelovanjem kiselog sadržaja želuca i žučnih kiselina, ima vrlo mali broj mikroorganizama. Ima još jedna važna činjenica koju treba zapamtiti u odabiru pravog probiotika za kliničku upotrebu. Samo manjina probiotika može razgraditi poluotporna vlakna kao što su oligofruktani - inulin i flein. Kada je bila proučavana sposobnost 712 različitih LAB(lactic acid bacteria) da fermentira oligofruktan, samo je 16 od 712 sojeva bilo u mogućnosti da fermentira flein i samo 8 od 712 da fermentira inulin. Samo četiri vrste LAB su mogle razgraditi oba vlakna, *Lactobacillus plantarum*(nekoliko sojeva), *Lactobacillus paracasei* podvrsta *paracasei*, *Lactobacillus brevis* i *Pediococcus pentosaceus*(60-61).

LAB također imaju sposobnost kontroliranja različitih patogena, koji se nalaze u crijevima. Ova sposobnost je specifična za soj, a često i ograničena na nekoliko vrsta. Kada su istraživali sposobnost pedeset različitih LAB u kontroliranju 23 različita patogena *Clostridium difficile* soja, samo 5 ih se pokazalo učinkovitima protiv svih, 8 protiv nekih patogenih *Clostridium difficile* soja, a 27 je bilo potpuno neučinkovito(62). Pet najučinkovitijih sojeva su bili: *Lactobacillus paracasei* podvrsta *paracasei*(2 soja) i *Lactobacillus plantarum*(3 soja). Jasno,

da je takva informacija jako važna kod izbora probiotika za kliničku uporabu. U zadnjih nekoliko godina postoji velik interes na tom području te postoji više studija, koje su proučavale učinak tih bakterija kod različitih bolesti i za vrijeme operativnih zahvata(63-68).

PREBIOTICI

Hrana dostupna u zapadnom svijetu temelji se na hranjivim tvarima malog broja biljaka. 80 % hranjivih tvari dolazi iz 17 biljaka, a 50% svih kalorija iz samo osam žitarica. Većina te hrane je prerađena. Hrana se često kondenzira, suši, zrači, stavlja u mikrovalnu pećnicu, pregrijava te se dodaju razni dodaci. Poznato je da se neki sastojci biljne hrane počnu razgrađivati već kod temperature od 28 stupnjeva Celzija, a važni enzimi i mikroorganizmi inaktiviraju se iznad 42 stupnjeva Celzija(43).

Uz to, hrana u zapadnom svijetu sadrži sve manje vlakana. Česta preporuka je da bi se dnevno moralo unijeti 30 – 35 grama biljnih vlakana, što znači oko pola kilograma voća i/ili povrća ili 5 do 8 komada na dan. Dnevni unos nije dovoljan u većini zemalja zapadne Europe i Americi, prije svega kod skupina sa niskim socijalnim statusom i prihodima. U Americi je procijenjen dnevni unos vlakana na 14 – 15 grama ili oko polovice preporučenog, a to je daleko od 60 – 80 grama vlakana za koje se misli da bi trebalo kako bi se očuvalo 1 – 2 kilograma mikroorganizma u debelome crijevu. Većina populacije zapadnog svijeta izgubila je sposobnost održavanja onog što se naziva normalnom florom(69).

Biljna ili po anglo-američkoj literaturi dijetna vlakna(dietary fiber) svrstavaju se u dvije osnovne skupine:

- Netopiva biljna vlakna - celuloza i hemiceluloza, lignin, otporni škrob
- Topiva biljna vlakna - pektini, beta-glukani, gume i sluzi.

Kemijski su dijetna vlakna sastavljena od neškrobnih polisaharida kao što su arabinoza, celuloza i mnoge druge biljne komponente: otporni škrob, otporni dekstrin, inulin, lignin, vosak, hitini, pektini, betaglukani i oligosaharidi. Riječ vlakno je zapravo pogrešan naziv za te tvari jer mnogi tipovi takozvanih dijetnih vlakana kemijsko i nisu vlakna.

Netopiva biljna vlakna.

Celuloza je najrasprostranjenije biljno vlakno u prirodi. Glavna je komponenta stijenke stanica viših biljaka, spada u ugljikohidrate, sastoji se od jedinica glukoze međusobno povezanih kemijskim vezama. Jedna molekula celuloze može imati čak do 10 000 jedinica glukoze. Celuloza zato ima izgled finih tankih niti. Kemijski je vrlo slabo reaktivna, što je posljedica njezinih fizikalnih svojstava. Celuloze najviše ima u mekinjama pšeničnog brašna, u punozrnatim žitaricama, u kori voća i povrća.

Hemiceluloza je također sastavljena od velikog broja jedinica heksoza, pentoza i uronskih kiselina, dakle i ona je polimer glukoze i drugih heksoza, pentoza i uronskih kiselina koje se nalaze u stijenkama gotovo svake biljne stanice. Ipak joj je lanac mnogo kraći pa obično ima od 20 do najviše 2000 jedinica. Celuloza i hemiceluloza su neprobavljivi ugljikohidrati u ljudskom organizmu i nepromijenjeni izlaze iz njega, iako se jedan manji dio razgradi fermentacijom bakterijama, koje se normalno nalaze u debelom crijevu svakoga zdravog čovjeka. Osim što potiču na pražnjenje stolice, ta vlakna navlače na sebe poput spužve mnogo vode i to čak 15 puta više nego su sama teška. Osim vode apsorbiraju i određene hranjive ali i toksične tvari.

Topiva biljna vlakna

U topiva vlakna spadaju pektini, gume i sluzi.

Pektini su također polimerizirani ugljikohidrati, ali se sastoje od drukčijih ugljikohidrata, a ne od onih koji se nalaze u celulozi i hemicelulozi. Naime, u molekuli pektina nalaze se ramnoza, galaktoza, arabinoza i još drugi ugljikohidratni spojevi. Najviše pektina ima u

jabukama i kruškama te u kori naranče i limuna. Prehrambena industrija koristi pektin za stabiliziranje i izradu emulzija raznih jela te kao tvar za izradu želatinske mase u džemovima.

U žitaricama(zob i ječam) ima jedna podvrsta pektina, takozvani betaglukan. Smatra se da pektini, osobito betaglukani, snižavaju kolesterol.

Gume su u vodi topivi, viskozni, gusti polisaharidi. Sadrže 10 000 do čak 30 000 jedinica i to glukozu, galaktozu, manozu, arabinozu, ramnozu i njihove uronske kiseline. Industrija hrane ekstrahira ih iz prirodnih izvora. To su arapska guma koju stvara stablo jedne akacije *Robinia pseudoacacia*, zatim tragakant guma iz nekih vrsta stabala, guar guma koja se dobiva iz jedne indijske mahunarke i guma iz dalmatinskoga rogača. Iz njih se izrađuju emulzije, stabiliziraju razne namirnice i zgušnjavaju sirovine pri industrijskoj obradi raznih vrsta hrane.

Sluzi su također polimeri ugljikohidrata. Prirodni im je izvor sjemenje i korijenje, koje služi biljkama kao sredstvo za sprječavanje isušivanja. Najviše ih ima prirodno u algama i morskoj travi. Prehrambena industrija koristi ih kao stabilizatore i ugušćivače u raznim jelima, npr. u sladoledu, u nekim mliječnim proizvodima itd.

Najčešći izvor vlakana u nas su kuhano korijenje i ostalo škrobno povrće ili žitarice, koje sadržavaju relativno mali udio vlakana, obično ne više od 1 – 3 grama po služenju. Inače, najviše zaliha vlakana ima takozvani otporni škrob koji kada ga ohladimo djelomično rekristalizira. Škrob se dijeli u tri skupine: brzo probavljivi(unutar 20 minuta nakon konzumacije), sporo probavljivi(između 20 i 120 minuta) i otporni / neprobavljivi(uopće se ne probavlja, nego fermentacijom u debelom crijevu postaje hrana za mikroorganizme). Izvori otpornog škroba su kuhani, ohlađeni krumpir, tjestenina, riža, leguminoze i kukuruz. Kad su krumpiri kuhani, njegove škrobne stanice nabubre i propadaju – to je proces koji se zove želatinizacija škroba što omogućuje lakše probavljanje krumpira. Kad se krumpiri nakon kuhanja ohlade, nešto želatiniziranog škroba pretvori se u kristalnu strukturu škroba koja se ne može probaviti i naziva se otporni škrob. Otporni škrob na našu probavu ima sličan učinak

kao vlaknaste žitarice – završava u debelom crijevu i pridonosi pravilnijem radu probavnog trakta.

Drugi najveći izvor vlakana su neškrobni polisaharidi(celuloza, pektini), a treći oligosaharidi(luk, artičoke, banane).

Vjeruje se da je Hipsley 1953. godine bio prvi koji je upotrijebio izraz dijetno vlakno kao skraćenicu za neprobavljive sastojke koji čine stijenku biljnih stanica(70). Očito je na taj način pokušao razlučiti dijetna biljna vlakna, koja imaju neka pozitivna svojstva, od širokog izraza biljna vlakna, koji obuhvaća sve skupa. Definicija se kasnije više puta mijenjala i dopunjavala.

Između 1972. i 1976., Trowell, Burkitt, Walker, Painter i suradnici(71-75) preuzeli su Hipsleyev termin i počeli govoriti o hipotezi dijetnih vlakana, čime su pokušali definirati pozitivne učinke dijetnih vlakana na zdravlje. Izraz su koristili za ostatke biljnih komponenti koje su otporne na hidrolizu ljudskim probavnim enzimima. Među dijetna vlakna su svrstali celulozu, hemicelulozu, lignin i pridružene dodatne tvari, kao što su vosak, kutin i suberin. U svojim radovima su istraživali odnos između unošenja dijetnih vlakana i raka debelog crijeva te bolesti srca. Objava hipoteze dijetnih vlakana dovela je do brojnih istraživačkih projekata u kojima se dijetna vlakna koriste u prehrani i prehrambeni tehnologiji.

Fiziološka definicija je bila dopunjena međunarodnim znanstvenim istraživanjima i potvrđena od AACCC(American Association of Cereal Chemist) po kojima su dijetna vlakna jestivi dijelovi biljaka ili analognih ugljikohidrata koji su otporni na probavu i apsorpciju u ljudskom tankom crijevu, sa potpunom ili djelomičnom fermentacijom u debelom crijevu. Dijetna vlakna uključuju polisaharide, oligosaharide, lignin i dodatne biljne tvari(76).

Izraz prebiotik za takva vlakna je prvi uveo Robefroid 1995. U svom radu je tvrdio da su prebiotici neprobavljivi sastojci hrane, koji stimuliraju rast i/ili aktivnost bakterija na način koji je dobar za zdravlje. Godine 2007 je popravio definiciju te tvrdi da je prebiotik selektivno

fermentirani sastojak koji omogućuje određene promjene u sastavu i / ili aktivnosti probavne mikroflore što povoljno djeluje na blagostanje i zdravlje domaćina.

Od svog uvođenja, prebiotici su privukli veliku pozornost, kako znanstvenu tako i industrijsku. Za mnoge hranjive sastojke, osobito oligosaharide i polisaharide (uključujući i dijetna vlakna) se smatralo da imaju prebiotičku aktivnost, bez potrebnih uvažavajućih kriterija.

Nisu svi prehrambeni ugljikohidrati prebiotici te moraju biti postavljeni jasni kriteriji za razvrstavanje sastojka hrane među prebiotike. Ti kriteriji su:

- 1) otpornost na želučanu kiselinu, na hidrolizu enzima sisavaca i gastrointestinalnu apsorpciju. To ne treba značiti da je prebiotik potpuno neprobavljiv ali moramo biti sigurni da ga ima dovoljno u debelom crijevu gdje služi za fermentaciju bakterija;
- 2) sposobnost fermentacije preko crijevne mikroflore;
- 3) selektivna stimulacija rasta i / ili aktivnosti onih crijevnih bakterija koje povoljno djeluju na blagostanje i zdravlje domaćina.

Slika 1: Predloženi mehanizmi korisnog djelovanja prebiotika na zdravlje (Crittenden, 1999., Šušković 2003)

SINBIOTIK

Kombinacija pojedinih bioaktivnih mikroorganizama – probiotika i specifičnih biljnih vlakna koji mogu stimulirati rast nekih mikroba – prebiotika , koji zajedno imaju sinergistički učinak, naziva se sinbiotik.

Postoji nekoliko mogućih mehanizama pomoću kojih sinbiotici imaju blagotvoran učinak na organizam:

- Antagonističko djelovanje protiv patogenih bakterija, bilo inhibicijom adherencije i translokacije ili proizvodnjom antibakterijskih tvari,
- Modulacija crijeвне barijere,
- Modulacija crijeвне produkcije citokina,
- Protuupalna svojstva
- Pобоljšanje propusnosti crijeva .

LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Lančana reakcija polimeraze(PCR) je široko raširena metoda molekularne biologije kojom je moguće u svega nekoliko sati dobiti milijarde identičnih kopija nekog ciljanog fragmenta DNK. Uvođenje PCR je izuzetno skratilo vrijeme i povećalo točnost DNK i RNK analiza. To je jednostavna *in vitro* kemijska reakcija, kod koje se ciljani fragment DNK neograničeno umnožava što je prije svega ostvareno sposobnošću DNK polimeraze, koja pod pravim uvjetima, može kopirati sekvencu DNK. PCR se temelji na eksponencijalnom i dvosmjernom pojačanju DNK fragmenta koristeći skup oligonukleotidnih početnica. Velika prednost PCR tehnike je njena brzina, učinkovitosti i ponovljivosti reakcije.

Za provođenje lančane reakcije polimeraze potrebno je imati:

- Izoliranu ciljnu DNK
- Dvije specifične početnice(engl. primer)za neki mikroorganizam, 15-20 baza

- Termostabilnu polimerazu(Taq)
- Smjesu 4 dNTP(deoksiribonukleotid), dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- MgCl₂+
- Odgovarajući pufer

Najčešće korištena termostabilna polimeraza je Taq(polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*). Radi se o termofilnoj bakteriji prvotno pronađenoj u Yellowstonu, čiji je životni optimum na 70 stupnjeva Celzija(50– 80 stupnjeva Celzija).

Svaki ciklus PCR se sastoji od tri koraka. Razdvajanja(denaturation), hibridizacije(annealing) i produljivanja(ekstension). Na kraju svakog ciklusa su produkti PCR teoretski podvojeni, dakle nakon jednog ciklusa, ciljna sekvencija je dva puta povećana. Idealno, nakon 20 ciklusa imamo milijun kopija a nakon 30 ciklusa milijardu. U praksi povećanje i nije tako veliko zbog ne potpuno optimalnih uvjeta reakcije ili prisutnosti inhibitora DNK polimeraze.

Na početku PCR reakcijska mješavina se zagrije na visoku temperaturu(95 stupnjeva Celzija). U toj fazi se ciljna DNK razdvoji na dva lanca. Potom se mješavina ohladi na 55 – 65stupnjeva Celzijusa što omogući početnicama da se povežu na svoje komplementarne sekvence na ciljnoj DNK. U trećem koraku, produljivanju, smjesa se ponovo zagrije na 72 stupnjeva Celzijusa i DNK polimeraza onda počinje graditi nove DNK lance dodavanjem specifičnih deoksiribonukleotida na spojene početnice. Produkti ekstenzije se luče od ciljne DNK i predstavljaju identičnu kopiju. Ova tri koraka se ponove 35 – 40 puta. Nakon svakog ciklusa, novo sintetizirani DNK lanci služe kao uzorak za daljnju sintezu DNK što vodi do eksponencijalnog porasta i produkcije 10^7 do 10^{11} identičnih kopija iz jedne same početne DNK.

Učinkovitost PCR pojačanja ovisi o mnogim čimbenicima, uključujući kvalitetu izolirane ciljne DNK , broju kopija, optimalnih početnica i idealnih uvjeta same reakcije.

Kada je PCR postupak gotov, produkte povećanja pregledamo, analiziramo i interpretiramo pomoću agaroznog gela u koji je dodan eidihev bromid. Signal, dobiven na taj način uspoređujemo sa pozitivnim i negativnim kontrolama te molekulskim markerom.

2 HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

HIPOTEZA

Kod bolesnika koji preoperativno primaju sinbiotik, dolazi do porasta broja probiotičkih bakterija na sluznici debelog crijeva, te ti bolesnici imaju slabiji upalni odgovor nakon operacije, manje postoperativnih komplikacija, brži oporavak te kraće trajanje hospitalizacije.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

OPĆI CILJEVI

Opći cilj našeg istraživanja je uvođenje nove metode za preoperativnu pripremu bolesnika prije elektivnih kolorektalnih kirurških zahvata. Čišćenje crijeva kao mehanički postupak pripreme kod elektivnih operacija debelog crijeva htjeli smo zamijeniti preoperativnom pripremom crijeva uz primjenu sinbiotika. Nakon preoperativne primjene sinbiotika očekivali smo veću koncentraciju probiotičkih bakterija na sluznici debelog crijeva, što može imati povoljan učinak na postoperativni tijek i ukupno smanjenje postoperativnih komplikacija.

SPECIFIČNI CILJEVI

- 1) Dokazati razliku u broju LAB na sluznici debelog crijeva između bolesnika, koji su uzimali sinbiotik, prebiotik i kontrolne skupine.
- 2) Dokazati razliku u stupnju sustavnog upalnog odgovora nakon operacije između bolesnika koji su uzimali sinbiotik, prebiotik i kontrolne grupe.
- 3) Dokazati razliku u broju postoperativnih komplikacija između bolesnika koji su uzimali sinbiotik, prebiotik i kontrolne grupe.

ZNANSTVENI DOPRINOS ISTRAŽIVANJA

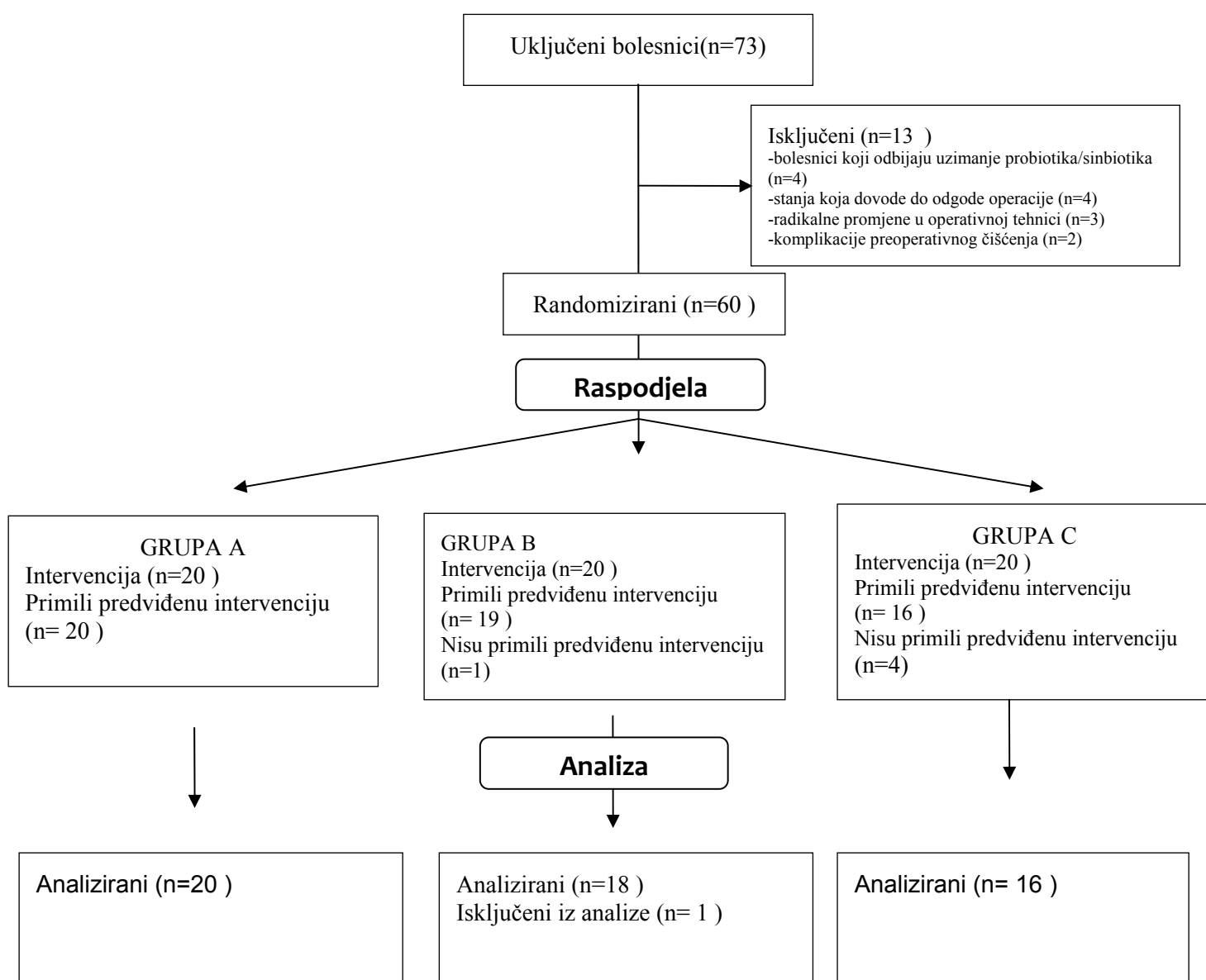
Rezultati ovog istraživanja mogu pomoći u boljem razumijevanju uloge probiotika i prebiotika kod svih bolesnika, a osobito u kirurških bolesnika i njihovoj pripremi za operativni zahvat što u budućnosti može dovesti do razvoja novih terapijskih modaliteta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno ukupno 73 bolesnika sa predstojećom operacijom debelog crijeva zbog raka. Dijagnoza raka debelog crijeva je postavljena na temelju kliničkih, endoskopskih i histoloških karakteristika. 13 bolesnika je bilo isključeno iz studije zbog različitih razloga(Slika 1)

Slika 1 – Protokol studije



Kriteriji za isključivanje su bili :

- a) Svaka kronična bolest ili zdravstveno stanje koja bi po mišljenju istraživaća mogla onemogućiti bolesnika da zadovolji protokol istraživanja ili izložila ispitanika nepotrebnom riziku,
- b) bolesnici sa znakovima crijevne opstrukcije,
- c) bolesnici koji nisu mogli podnijeti mehaničku preoperativnu pripremu crijeva,

Neki bolesnici isključeni su iz studije u slijedećim slučajevima:

- a) značajna povreda protokola ili nepridržavanje od strane bolesnika,
- b) odbijanje bolesnika da nastavi postupak,

54 bolesnika je bilo prikladnih za statističku analizu.

3.1. Postupci i preparati

Bolesnici su bili podijeljeni u tri skupine sa zapečaćenim neprozirnim omotnicama. Bilo je 60 omotnica, u omjeru 1:1:1 (Slika 1). Jednom, kada je bolesnik pristao ući u ispitivanje, izabrao je i otvorio jednu od omotnica te prema tome ušao u skupinu A, B ili C.

Sinbiotici i prebiotici su bili pohranjeni u identične vrećice s različitim oznakama, AA i AB te su bili u obliku bijelog praha, identični u masi, mirisu i okusu. Točan sadržaj vrećica nije bio poznat sudionicima i istraživačima do kraja istraživanja

Lijekovi u istraživanju

Vrećice označene AA sadržavale su Synbiotic 2000Forte, koji sadrži 10^{11} svake od četiri LAB: *Pediococcus pentosaceus* 5-33:3, *Leuconostoc mesenteroides* 32-77:1, *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* 19 i *Lactobacillus plantarum* 2362. To čini 400 milijardi LAB po dozi ili ako doziramo dva puta dnevno 800 milijardi LAB na dan. U vrećicama se nalazi i 2,5 grama svakog od četiri vlakana – prebiotika: betaglukan, inulin, pektin i otporni škrob. Synbiotic 2000Forte proizvodi i prodaje Medipharm, Kageröd Švedska i Des Moines, Iowa, SAD.

Vrećice AB sadrže samo prebiotik po 2,5 g od svakog od četiri vlakana – prebiotika: betaglukan, inulin, pektin i otporni škrob.

Coloclenz(*Senna glykosides*) je antrakinon laksativ posebno pripremljen za čišćenje prije elektivnih abdominalnih zahvata.

Golitely(polietilen glikol) je osmotski agens, koji je učinkovit u čišćenju debelog crijeva prije elektivnih operacija debelog crijeva.

Bolesnici u sve tri skupine su jeli normalno prije operacije. Tri dana prije operacije bolesnici u skupini A su dobili po jednu vrećicu sa natpisom AA dva puta dnevno.

U literaturi postoji mnogo različitih režima uzimanja sinbiotika a posebno preparata Synbiotic 2000Forte prije operacije(77-82). Usprkos detaljnom pregledu nismo mogli pronaći konsenzusa glede preporučene dnevne doze. Nakon konzultacije sa proizvođačem i profesorom Bengmarkom, vodećim stručnjakom na tom području, odlučili smo se za jednu vrećicu dva puta dnevno počevši tri dana prije operacije. Jedan od istražitelja je pomiješao sadržaj vrećice sa 1 decilitrom tople vode i bolesnik je to konzumirao. Bolesnici u skupini B su dobili jednu vrećicu sa natpisom AB dva puta dnevno tri dana prije operacije. Konačno bolesnici u skupini C bili su tretirani po protokolu naše ustanove prije operacije. Na dan prije

operacije su dobili 75 ml preparata Coloclen R. Nakon nekoliko sati, popodne istog dana su bolesnici morali popiti još 4 litre hiperosmolalne tekućine Golitely.

Procjenu sistemskog upalnog odgovora vršili smo slijedećim mjerenjima:

- razina C reaktivnog proteina,
- razinom citokina: interleukina – 6,
- razinom fibrinogena
- razinama bijelih krvnih stanica i diferencijalnom krvnom slikom(83).

Uzorci 10 ml krvi uzeti su na dan operacije, dva sata prije zahvata, te prvi i treći dan poslije operacije. Krv je uzimala kvalificirana medicinska sestra po standardnom medicinskom protokolu.

ASA(American Society of anesthesiologists) vrijednost je izračunana prije operacije za svakog bolesnika.

Za sve bolesnike smo izračunali indeks tjelesne mase.

Svi su bolesnici primili preoperativno intravenski po jednu dozu antibiotika cefuroksim i metronidazol. To je standardni protokol u našoj ustanovi, a temelji se na rezultatima iz nekoliko kliničkih studija koje pokazuju da antibiotici aplicirani prije operacije smanjuju rizik postoperativne infekcije kirurške rane za najmanje 75%(84). Cilj antibiotske profilakse nije utjecaj na floru debelog crijeva, već postizanje dovoljno visoke koncentraciju antibiotika u području kirurške rane ako dođe do bakterijske kontaminacije(85).

Zanimali su nas klinički podaci:

- vrijeme prvog unosa tvrde hrane
- vrijeme prve peristaltike
- vrijeme prvog prolaza plinova

- vrijeme prve stolice
- komplikacije.

Komplikacije su bile definirane kao bilo kakvo odstupanje od normalnog postoperativnog toka. Najčešće komplikacije nakon operacije debelog crijeva su pareza crijeva, upale mokraćnih puteva, upala pluća i nespecifične infekcije. Iako u posljednje vrijeme mnoge studije pokazuju da bolesnici dobro podnose rano hranjenje nakon elektivne kirurgije debelog crijeva te da ono također pozitivno utječe na postoperativni ishod(86), zaključak je metaanalize Cochrane grupe, da je rano hranjenje nakon velikih abdominalnih operativnih zahvata sigurno, međutim može biti povezano sa povećanim rizikom za mučninu. Preporučuje se da bi pristup ranom hranjenju trebao biti prilagođen svakom bolesniku posebno(87).

Bolesnici su bili operirani po standardnim onkološkim načelima.

Dva uzorka sluznice su uzeta odmah nakon kirurškog uklanjanja crijeva sa tumorom. Oni su spremljeni na led i odmah prevezeni u laboratorij za određivanje broja *Lactobacillus* PCR metodom. Oligonukleotidne sekvence specifične za bakterije *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, i *Pediococcus pentosaceus* tražene su PCR – om u realnom vremenu.

Izolacija i pročišćavanje DNA je provedeno Qiagen DNK MiniKit-om po strogom protokolu proizvođača.

Premazi i sonde su dizajnirani za otkrivanje specifičnih sekvenci oligonukleotida u ciljnim genima navedenim u tablici 1. Otkrivanje određenih proizvoda je provedeno pomoću fluorescentno obilježenih hidroliziranih sonda(Taqman sonda). Pojačanje i otkrivanje je izvedeno u ABI Prism 7000 Sequence Detection System. U svim uzorcima, u kojim smo našli sekvencu oligonukleotida karakterističnu barem za jednu od četiri bakterija, proveli smo

relativnu kvantifikaciju bakterijske vrste sa real-time PCR. Kao referentni gen koristili smo gen za beta-globin, koji je dio ljudskog genoma.

Tablica 1 Ciljni geni za početnice i probe.

Bakterija	Ciljni gen
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>putative pheromone PcrA</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>acetat kinase</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>luxS</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>collagen adhesion gene 1158</i>

Svi postupci bili su u skladu s Helsinškom deklaracijom. Protokol pretrage je dobio odobrenje Etičkog povjerenstva UKC Maribor i Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Potpisani informirani pristanak je dobiven od svih bolesnika.

Podaci o bolesniku su prikupljeni u posebno pripremljenim protokolima od prijema do otpusta iz bolnice.

Statistička obrada podataka

Kvalitativni su podatci prikazani apsolutnim frekvencijama, a brojčani medijanom i rasponom vrijednosti jer im raspodjela nije slijedila normalnu. Mjerenja su uspoređena analizom varijance za ponavljana mjerenja, a rezultati prikazani svojstvenom vrijednošću F te razinama značajnosti P za testiranje razlike između skupina jedinka, između ponavljanih mjerenja i za cijeli model. Samo je $P < 0,05$ smatranom značajnim. Podatci su obrađeni uporabom programa MedCalc(MedCalc software, ver. 11, Mariakerke, Belgija). Snaga studije izračunata je s pomoću UCSF Biostatistics Power and Sample Size programa(dostupan na adresi <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize>) uz uvjete alfa pogreške 0,05 i rel. vrijednošću od

1 ± 1.4 oligonukleotidne sekvence za *Lactobacillus paracasei* uspoređene s vrijednošću 0 (dakle, koja se ne očekuje) u populaciji.

4. REZULTATI

Od 54 bolesnika, bilo je 21 žena i 33 muškaraca. Medijana dob je bila 65 godina između 43 i 87 godina. Prema ASA bodovniku smo podijelili bolesnike u tri skupine: ASA 1, ASA 2 i ASA 3 i 4 zajedno. Bolesnici u sve tri skupine dobro su podudarne po dobi, spolu i ASA nalazu, te nije bilo statistički značajne razlike između njih.

Tablica 2. Demografska analiza

Skupina	A	B	C
No.	18	20	16
Spol; muški/ženski	11/7	13/7	9/7
Dob; median (raspon)	62 (43 – 87) g	64 (46 – 81) g	67 (52 – 78) g
ASA rezultat (median)	1.72 (1-3)	2.15 (2-3)	2.06 (1-3)

Izvršili smo 26 resekcija sigmoidnog kolona, 16 desnih hemikolektomija, 8 prednjih resekcija rektuma, 3 lijeve hemikolektomije i jednu resekciju poprečnog debelog crijeva.

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) odredili smo relativnu koncentraciju svih četiriju danih LAB na sluznici debelog crijeva kod svih bolesnika. Razlika u broju je bila statistički značajna za sve četiri LAB ($p < 0,0001$) između skupina A i C ili A i B, no nije bilo statistički značajnih razlika između skupina B i C. Tablica 3

Tablica 3. Relativni broj (medijan) izoliranih bakterija na sluznici crijeva te usporedba između skupina A, B i C

	PAR	MES	PENT	PLANT
	median(min – max)	median(min – max)	median(min – max)	median(min – max)
A	0,47(0,1 – 33,2)	3,71(0-2534) x10E-3	3,36(0,1 – 57,5)	0,27(0 – 14,6)
B	2,18(0-000)x10E-2	0(0 – 0,01)	0(0 – 2,7)	0(0 – 3,3)
C	8,73(0-224)x10E-3	0(0 – 0,03)	0(0 – 4,1)	0(0 – 0,4)
Chi-Square	24,976	25,126	37,110	29,455
P	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

PAR - *Lactobacillus paracasei*, MES - *Lactobacillus mesenteroides*, PENT - *Pediococcus pentosaceus*, PLANT - *Lactobacillus plantarum*

Kod određivanja sustavnog upanog odgovora smo ustanovili, da između skupina ne postoji statistički značajna razlika u sustavnom upalnom odgovoru koji je ocijenjen s tri uzastopna mjerenja CRP, IL-6, fibrinogena, leukocita i diferencijalnom krvnom slikom prije operacije, prvog i trećeg poslijeoperativnog dana. Tablica 4.

Tablica 4. Vrijednosti tri mjerenja CRP u skupinama i njihova usporedba analize varijance za ponavljana mjerenja(F-vrijednost analiza varijance, P-razina značajnosti).

CRP	Groups				F P
Ponavljana mjerenja	A median(min – max)	B median(min – max)	C median(min – max)	Ukupno median(min – max)	
prvo	2 (0-117)	4 (1-150)	3 (1-47)	3 (0-150)	121.15 ^a <0,001
drugo	90 (29-228)	98 (44-252)	93 (21-145)	93 (21-252)	
treće	104 (27-262)	103 (16-239)	88 (24-177)	101 (16-262)	
F	1.32 ^b				0.11 ^c
P	0.227				0.979

a Usporedba ponovljenih mjerenja(post-hoc test sa $P < 0,05$ postoji razlika između prvog i drugog te prvog i trećeg mjerenja, dok se drugo i treće mjerenje ne razlikuju).

b Usporedba vrijednosti između skupina A, B i C.

c Usporedba kombiniranog učinka, odnosno utjecaj pripadnosti skupinama A, B i C na ponovljenim mjerenjima.

Tablica 5. Vrijednosti triju mjerenja IL-6 u skupinama i njihova usporedba analize varijance za ponovljena mjerenja(F-vrijednost analiza varijance, P-razina značajnosti).

IL-6	Groups				F P
broj mjerenja	A	B	C	Together	
prvo	2.6 (2-16)	5 (2-25)	4.05 (2-49)	3.95 (2-49)	96.70 ^a <0.001
drugo	103.5 (6-235)	67.9 (9.9-323)	63.7 (21.5-224)	67.6 (6-323)	
treće	13.4 (4.2-96.4)	15.3 (3.2-56.7)	12.6 (6.7-132)	14.3 (3.2-132)	
F	1.36 ^b				0.67 ^c
P	0.701				0.611

a a Usporedba ponovljenih mjerenja(post-hoc test sa $P < 0,05$ postoji razlika između prvog i drugog te prvog i trećeg mjerenja, dok se drugo i treće mjerenje ne razlikuju).

b Usporedba vrijednosti između skupina A, B i C.

c Usporedba kombiniranog učinka, odnosno utjecaj pripadnosti skupinama A, B i C na ponovljenim mjerenjima.

Kod mjerenja IL-6 postoji mala razlika među skupinama, međutim ta razlika nije statistički značajna.

Kod obrade podataka za promatrane kliničke parametre: prva peristaltika(FP), prvi oralni unos tvrde hrane(FSOFI), prvo pražnjenje plinova(POG) i prva stolica(POS) nismo mogli dokazati statističko značajne razlike među skupinama. Otkrili smo malu prednost u skupinama A i B napram skupine C ali razlika nije bila statističko značajna.

Tablica 6. Usporedba prve peristaltike, prvog unosa tvrde hrane, prvog pražnjenje plinova i prvi prolazak stolice između tri skupine(P, razina značajnosti)

Group	A	B	C	P
	median (min-max)	median (min-max)	median (min-max)	
FP	1.9(1-3)	1.5(1-3)	2.2(1-4)	0.580
FSOFI median(min-max)	5.2(2-10)	4.95(3-10)	5.4(3-9)	0.621
POG median(min-max)	2,7(2-4)	2,5(1-4)	2,8(2-5)	0,873
POS median(min-max)	4.2(2-8)	3.8(2-6)	3.8(2-6)	0.752

* prva peristaltika(FP), prvi unosatvrde hrane(FSOFI), p prvo pražnjenje plinova(POG) and prvi prolazak stolice(POS).

Medijan vremena hospitalizacije nakon operacije bilo je 10,68 dana sa najmanje sedam, a najviše 25 dana. U skupini A medijan trajanja hospitalizacije iznosio je 10,16 dana , u skupini B 11,30 dana i u skupini C 10,5 dana. Vrijeme hospitalizacija je bilo duže u kontrolnoj skupini, ali razlika nije bila statistički značajna($p=0,512$).

Nije bilo većih komplikacija. 9 bolesnika imalo je postoperativnu parezu crijeva, kod četiri bolesnika je došlo do upale operativne rane i kod dvoje do upale pluća. Sve komplikacije su liječene konzervativno. Stopa komplikacija je bila niska i između skupina nije bilo statističko značajne razlike.

5. RASPRAVA

Jedan od problema kod peroralne aplikacije probiotika je prolaz biološko aktivnih supstancija do debelog crijeva. Poznato je da LAB u nekim probioticima, koji su trenutno opće dostupni u komercijalnoj prodaji u mnogim slučajevima uopće ne prođu želudac, dvanaesnik i tanko crijevo. Oni su uništeni i fermentirani snažnom želučanom kiselinom i sokovima dvanaesnika, većinom i ne dođu do debelog crijeva koje je zapravo jedini dio probavnog trakta, gdje bi ti probiotici mogli biti korisni. Istina je, da i mrtvi mikroorganizmi mogu imati fiziološki pozitivne učinke, primjerice snabdijevanje određenih enzima intestinalnim stanicama, ali po definiciji mrtvi mikroorganizmi nisu probiotici.

Mi smo za naše istraživanje smo odabrali kombinaciju četiri probiotika i četiri različita prebiotika koja su već testirana u nekoliko drugih studija i pokazala se sigurnima(77-82). Preparat je napravljen nakon opsežnih istraživanja više od 350 humanih i više od 180 biljnih sojeva na sveučilištu Lund u Švedskoj(88-89). Mikrobiolozi Asa Ljungh i Torkel Wadström su potom odabrali četiri LAB na temelju sposobnosti različitih LAB za proizvodnju bioaktivnih proteina, za transkripciju NF-kapaB(NF-kappaB je kompleks faktora transkripcije, koji igra središnju ulogu u mnogim biološkim procesima, uključujući i upalne procese), za proizvodnju pro i anti-upalnih citokina, za proizvodnju antioksidanta, te za funkcionalno međusobno dopunjavanje. Odabrani LAB pojedinačno djeluju različito ali kad se daju zajedno pokazuju jak sinergistički učinak.

Odabrana kombinacija, koja se naziva Synbiotic 2000Forte je bila upotrjebljena u više ranijih istraživanja kod kojih su istraživali mogući pozitivan učinak probiotika kod različitih bolesti međutim rezultati nisu bili jednoznačni.

Kotzampassi i suradnici su istraživali učinak Synbiotic 2000Forte kod kritično bolesnih bolesnika nakon traume. Rezultati randomiziranog kontroliranog istraživanja pokazuju pozitivan učinak sinbiotske terapije na upalu i učestalost sepse. Bolesnici koji su primali sinbiotik kraće su zahtijevali mehaničku ventilacijsku potporu te je zabilježeno kraće trajanje

hospitalizacije u jedinici intenzivne njege(78). Pozitivan učinak su potvrdili i Olah i sur., koji su istraživali djelovanje Synbiotic 2000Forte kod teškog akutnog pankreatitisa te Spindler – Vesel i suradnici koji su primjenjivali navedeni preparat u teško povrijeđenih bolesnika(79-80).

S druge strane Chermes i sur. nisu uspjeli dokazati, da Synbiotic 2000 ima bilo kakav učinak kod bolesnika s Crohnovom bolesti koji su liječeni kirurški. U navedenom istraživanju dokazano je kako ne postoji statistički značajna razlika u smanjenju recidiva bolesti kod bolesnika koji su uzimali sinbiotik i bolesnika koji su dobivali placebo(81).

Knight je istraživao učinak sinbiotske terapije na incidenciju ventilacijske pneumonije kod kritično bolesnih. Zaključio je da enteralna primjena Synbiotic 2000Forte nema statistički značajan učinak na incidenciju ventilacijske pneumonije(82).

Međutim, niti jedno od tih istraživanja nije bilo usmjereno određivanju prisutnosti LAB na sluznici debelog crijeva nakon peroralne ili enteralne primjene što je izuzetno važno s obzirom da je ta sluznica mjesto, gdje sinbiotici imaju glavni učinak. U našem istraživanju smo dokazali, da su sve četiri vrste LAB, koje su aplicirane, bile prisutne na sluznici debelog crijeva kod bolesnika koji su primali sinbiotike u znatno višem omjeru nego u bolesnika, koji su primili samo prebiotike i kod bolesnika koji su bili preoperativno čišćeni.

Usporedno sa studijama upotrebe pre i probiotika kod kritično bolesnih i kod autoimunih bolesti u svijetu je bilo već više pretraga upotrebe tih preparata kod kirurškog bolesnika. Do danas je provedeno više od 20 različitih randomiziranih studija o upotrebi prebiotika, probiotika i sinbiotika kod kirurškog bolesnika, bilo da se radi o primjeni tih preparata u preoperativnoj pripremi, za vrijeme operacije ili u poslijeoperativnom razdoblju. Od prebiotika i probiotika se očekuje da poboljšanjem imunološke funkcije utječu na smanjenje stope infekcija nakon elektivnih operacija, čime se smanjuje stopa komplikacija i skraćuje vrijeme hospitalizacije. U našem istraživanju očekivali smo da bi sinbiotici mogli imati

pozitivan učinak na naše bolesnike: slabiji postoperativni upalni odgovor, nižu stopu komplikacija i skraćenje duljine trajanja hospitalizacije. Iako rezultati istraživanja pokazuju pozitivne učinke kod bolesnika koji su dobivali prebiotike i probiotike, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu nije dokazana. Pregledom dostupne literature u posljednjih 20 godina, utvrdili smo kako ne postoje jednoznačni rezultati što se tiče dobrobiti prebiotika i probiotika kod kirurških bolesnika. Većina studija je ipak uspjela dokazati pozitivan učinak takvih preparata a postoje i studije, gdje razlika nije bilo.

Već 2004 godine su Anderson i suradnici objavili randomiziranu kliničku studiju o utjecaju sinbiotika kod bolesnika podvrgnutih elektivnom kirurškom zahvatu. Pretpostavljali su da bi aplikacija sinbiotika mogla promijeniti sastav crijevne flore a to bi imalo pozitivan učinak na crijevnu barijeru, što bi smanjilo udio bakterijskih infekcija. Ipak, Anderson je zaključio, da sinbiotici nisu imali učinka na njihove bolesnike(90).

Rayes i suradnici su objavili meta analizu 15 randomiziranih kontrolnih studija objavljenih do 2008. U analizu je uključeno 11 studija u kojim su istraživali sinbiotike i 4 u kojim su istraživali probiotike. U 12 istraživanja probiotici ili sinbiotici imali su povoljan učinak, dok u tri studije koje je objavila ista skupina znanstvenika, nije bilo značajnog pozitivnog učinka takvog liječenja. Razlozi za nedostatak pozitivnog učinka su po Rayesu prekratko vrijeme uzimanja preparata, peroralni(umjesto jejunalni) put primjene sa nejasnim preživljavanjem probiotika u želucu zbog niskog pH i nehomogena distribucija operacija s visokim postotkom takozvanih „low risk“ operacija(jednostavne kolektomije), kod kojih i inače postoji niska stopa bakterijskih translokacija i upala(91)(91).

Tanaka je objavio prospektivno randomizirano istraživanje perioperacijske primjene sinbiotika u bolesnika s rakom jednjaka i ezofagektomijom(92). Probiotici su bili *Bifidobacterium breve* i *Lactobacillus casei*. S aplikacijom sinbiotika počeli su jedan dan prije operacije, a bolesnici su također primili profilaktički jednu dozu antibiotika. Zaključak je

bio da je perioperativna aplikacija sinbiotika u bolesnika s ezofagektomijom korisna jer oni potiskuju pretjerani upalni odgovor i smanjuju neugodne simptome nakon tako velike operacije kroz prilagodbu crijevna mikroflore.

U metaanalizi koju je napravio Santvoort pregledano je 14 randomiziranih kontrolnih studija probiotika, prebiotika i sinbiotika u kirurških bolesnika(93). 11 studija istraživalo je utjecaj sinbiotika a tri isključivo učinak probiotika. Devet studija je dokazalo značajno smanjenje infektivnih komplikacija u bolesnika koji su primali probiotike ili sinbiotike, dok pet studija nije dokazalo statističko značajno smanjenje takvih komplikacija. Santvoort tako velike razlike u rezultatima opravdava velikim metodološkim razlikama među studijama a i drugim važnim čimbenicima, kao što su primjena različitih probiotika, kombinacije probiotika, heterogene grupe bolesnika i različite operacije.

Zadnja metaanaliza, koja proučava utjecaj probiotika i sinbiotika u elektivnoj kirurgiji objavljena je u ožujku 2013. U toj metaanalizi su Kinross i suradnici pregledali 13 najnovijih randomiziranih kontroliranih studija sa probioticima i sinbioticima(94). Zaključili su da je kako probiotska kao i sinbiotska terapija sigurna i da smanjuje mogućnost septičkih komplikacija nakon elektivnih kirurških zahvata. Moguće je i da sinbiotska terapija skraćuje vrijeme aplikacije antibiotika. U svom radu su istaknuli potrebu za daljnjim smjernicama u vezi dizajna daljnjih pretraga na tom brzo rastućem području istraživanja kliničke prehrane, što je jako važno ako želimo homogenizirati buduća istraživanja.

Kad revidiramo sve dostupne studije i metaanalize te zaključke i rezultate usporedimo sa rezultatima našeg istraživanja postavlja se pitanje zašto nismo mogli dokazati pozitivan učinak probiotika i sinbiotika. Možemo zaključiti da su probiotici u našem istraživanju bili prisutni u debelom crijevu, da su prošli želudac i tanko crijevo i da su tako bili na optimalnome mjestu za njihovo djelovanje. Rayes je uzrok za neuspjeh studija, koje je pregledao u svojoj metaanalizi, tražio u načinu aplikacije probiotika i/ili sinbiotika, vremenu i

dozama probiotika i/ili sinbiotika i različitim operacijama kod kojih se je probiotik i/ili sinbiotik primjenjivao. U našem istraživanju možemo isključiti faktor aplikacije. Iako su bolesnici uzimali probiotik i sinbiotik na usta, mi smo LAB dokazali u debelom crijevu i date bakterije nisu bile uništene prije. Drugi čimbenik, koji je po Rayesu važan za negativan ishod studija je heterogenost operacija, međutim, kod nas su sve operacije bile jednake, i nije bilo velike razlike u njihovoj težini. Jedini čimbenik, koji bi možda mogao utjecati na rezultate može biti vrijeme uzimanja i doza apliciranih preparata. Kao što smo već spomenuli ne postoji standardni protokol po kome bi bilo određeno koliko bi prije i nakon operacije trebalo uzimati probiotike. U tablici 7 smo usporedili 17 randomiziranih studija, koje su proučavale utjecaj probiotika i/ili sinbiotika kod kirurških bolesnika i koje su uz ostale podatke specificirale i vrijeme te količinu uzimanja pro i/ili sinbiotika i još pet dodatnih studija koju su proučavale upravo Synbiotik 2000 kod teško bolesnih.

Tablica 7 Usporedba randomiziranih studija koje proučavaju utjecaj probiotika i sinbiotika kod kirurških i teško bolesnih bolesnika

Godina	Autor	Indikacija	Vrijeme aplikacije(dani)	Vrsta preparata
		Kirurški bolesnici		
2002	Rayes et al(95)	Velika abdominalna operacija(n=90)	6 preoperativno	Lact. plantarum
2002	Rayes et al(96)	Transplantacija jetre(n=95)	12 pooperativno	Lact. plantarum
2002	McNaught et al(97)	Velika abdominalna operacija(n=129)	9 preoperativno 5 poslijeoperativno	Lact. plantarum
2004	Woodcock et al(98)	Velika abdominalna operacija(n=22)	5-18 preoperativno	Lact. plantarum
2004	Anderson et al(90)	Velika abdominalna operacija(n=137)	12 preoperativno 4 poslijeoperativno	Lact. acidophilus, Bifidobact. lactis, Streptococcus thermophilus, Lact. bulgaricus
2005	Rayes et al(99)	Transplantacija jetre(n=66)	1 preoperativno 14 poslijeoperativno	Synbiotic 2000
2005	Kanazawa et al(100)	Jetra i žučni vodovi(n=44)	14 poslijeoperativno	Bifidobacterium breve, Lactobacillus casei
2006	Sugawara et al(101)	Jetra i žučni vodovi(n=101)	14 preoperativno 14 poslijeoperativno	Bifidobacterium breve, Lactobacillus casei
2007	Reddy et al(102)	Abdominalna operacija(n=92)	Nepoznato	Lact. acidophilus, Lact. bulgaricus, Bifidobacterium lactis, Streptococcus thermophilus
2007	Rayes et al(103)	Pankreatoduodenektomija(n=80)	1 preoperativno 8 poslijeoperativno	Synbiotic 2000
2007	Nomura et al(104)	Pankreatoduodenektomija(n=64)	3 – 15 preoperativno Poslijeoperativno do otpusta	Enterococcus faecalis, Clostridium butyricum, Bacillus mesentericus
2009	Woodard et al(105)	Operacija zbog pretilosti(n=44)	180 poslijeoperativno	Lactobacillus species
2010	Gianotti et al(106)	Resekcija kolorektalnog raka(n=31)	4 preoperativno 3 poslijeoperativno	Lact. johnsonii, Bifidobacterium longum
2010	Liu Quin et al(107)	Resekcija kolorektalnog raka(n=100)	6 preoperativno 10 poslijeoperativno	Lact. plantarum, Lact. acidophilus, Bifidobacterium longum
2011	Diepenhorst et al(108)	Pankreatoduodenektomija(n=30)	7 preoperativno 7 poslijeoperativno	Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Lact. acidophilus, Lact. casei, Lact. salivarius, Lactococcus lactis
2011	Eguchi et al(109)	Transplantacija jetre(n=50)	2 preoperativno 14 poslijeoperativno	Bifidobacterium breve, Lactobacillus casei
2012	Tanaka(92)	Operacija jednjaka zbog raka(n=70)	1 preoperativno 21 poslijeoperativno	Bifidobacterium breve, Lactobacillus casei
		Nekirurški bolesnici sa Synbiotic 2000		
2006	Kotzampassi et al(78)	Bolesnici poslije teške povrijede(n=65)	15	Synbiotic 2000
2007	Spindler-Vesel et al(79)	Bolesnici poslije teške povrijede(n=113)		Synbiotic 2000
2007	Olah et al(80)	Pankreatitis(n=62)	7	Synbiotic 2000
2007	Chermesh et al(81)	Crohnova bolest(n=30)	>30	Synbiotic 2000
2008	Knight et al(82)	Pneumonia kod teško bolesnih(259)	2 – 28	Synbiotic 2000

Možemo vidjeti, da postoji izrazita heterogenost na svim područjima. Od same operacije, vremena aplikacije prije i poslijeoperativno, doze preparata, pa do samih probiotika, gdje se u studijama koristi više od deset različitih bakterija. Sve to utječe na rezultate studija. Od tih 20 randomiziranih studija 14 je uspjelo dokazati pozitivan učinak pro i/ili sinbiotika a šest ne. Vjerojatno postoji više od jednog razloga za to:

- Broj bolesnika, koji je prenizak
- Prilike u kojim se aplicira probiotik su previše različite
- Različite bakterije u probiotskom preparatu
- Različite kombinacije bakterija u probiotskom preparatu
- Premala doza bakterija u probiotskom preparatu
- Interakcije između bakterija u kombiniranim preparatima

Za naš režim aplikacije probiotika i sinbiotika smo odlučili nakon pomnog razmišljanja i konzultacije sa proizvođačem i vodećim stručnjacima na tom području, međutim, danas bi vjerojatno izabrali duži režim uzimanja i uključili postoperativnu aplikaciju.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati našeg prospektivnog randomiziranog dvostruko slijepog istraživanja ukazuju na to da se nakon peroralnog unosa Synbiotica 2000 Forte, koji sadrži četiri različita laktobacila, ti laktobacili nalaze na sluznici debelog crijeva. Istraživanje također pokazuje da primjena sinbiotika i prebiotika tri dana prije operacije nema utjecaja na sustavni upalni odgovor, procijenjen ponavljanim mjerenjima IL-6, CRP, diferencijalnom krvnom slikom i fibrinogenom te nema učinka na postoperativni tijek.

7. SAŽETAK

CILJEVI: Cilj našeg istraživanja bio je dokazati da bolesnici s rakom debelog crijeva, koji su preoperativno dobivali sinbiotik ili prebiotik, imaju veću koncentraciju laktobacila na sluznici debelog crijeva. Također smo pokušali dokazati da je sustavni upalni odgovor, nakon operacije, manji u bolesnika koji su uzimal sinbiotik ili prebiotik i da ovi bolesnici imaju manje postoperativnih komplikacija i povoljniji postoperativni tijek.

METODE: U istraživanje je uključeno 73 bolesnika predviđenih za operativni zahvat na debelom crijevu. Bolesnici su podijeljeni u tri skupine. Jedna skupina dobila je prije operacije prebiotik, druga sinbiotik, a treća je bila preoperativno čišćena. Lančanom reakcijom polimeraze(PCR) pokušali smo dokazati prisutnost četiri različite probiotičke bakterije, prisutne u apliciranom sinbiotiku, na sluznici kolona. Prije i nakon operativnog zahvata, pomoću serijskih mjerenja serumske razine interleukina-6, CRP-a, fibrinogena, leukocita i diferencijalne krvne slike, mjerili smo sustavni upalni odgovor. Postoperativno smo pratili četiri različita klinička čimbenika: prvu peristaltiku, prvi unos tvrde hrane, prvo pražnjenje plinova i prvi prolazak stolice.

REZULTATI: U grupi bolesnika, koja je dobivala sinbiotik, na sluznici debelog crijeva smo dokazali statistički značajno više laktobacila nego u ostale dvije grupe. S druge strane, nismo pronašli nikakve statističke razlike u sustavnom upalnom odgovoru. Također nije bilo razlike u postoperativnom tijeku i broju komplikacija između sve tri skupine.

ZAKLJUČAK: Nakon peroralnog unosa Synbiotica 2000Forte, koji sadrži četiri LAB, ti laktobacili se nalaze na sluznici debelog crijeva. Istraživanje također pokazuje da primjena sinbiotika i prebiotika tri dana prije operacije nema utjecaja na sustavni upalni odgovor, procijenjen ponavljanim mjerenjima IL-6, CRP, diferencijalnom krvnom slikom i fibrinogenom te nema učinka na postoperativni tijek.

8.ABSTRACT

Synbiotics application in the preoperative preparation of patients for elective colorectal cancer surgery

Bojan Krebs, Zagreb, 2013

AIM: The aim of our study was to demonstrate higher concentration of lactic acid bacteria (LAB) at the colonic mucosa in patients treated with oral intake of synbiotics. We also tried to prove that the systemic inflammatory response after surgery is less severe in patients who either took synbiotics or prebiotics and that these patients have less postoperative complications and a favorable postoperative course.

METHODS: 73 patients with preceding colorectal operations were recruited. They were randomized into three groups. One group received preoperatively prebiotics, the second synbiotics in and third was preoperatively cleansed. We have defined the number of four different probiotic bacteria on colonic mucosa with polymerase chain reaction(PCR). Serum levels of interleukin-6, CRP, fibrinogen, white cell count and differential blood count were measured pre- and postoperatively to determine systemic inflammatory response.

RESULTS: We found out that in the synbiotic group there were considerably more LAB presented on the mucosa. They did pass the upper gastrointestinal tract and were isolated in colonic mucosa. On the other hand, we did not find any statistical differences in systemic inflammatory response measured by upper factors and no differences in postoperative course and complications rate between all three groups.

CONCLUSIONS: LAB used in our study reach the large bowel mucosa after oral intake but in our case that didn't seem to have an effect on postoperative course following colorectal surgery for cancer.

9. LITERATURA

- 1) Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546–1554
- 2) Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL i sur. Sepsis in European intensive care units: the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344–353
- 3) Hall JE. Resistance of the Body to Infection. U: Hall JE, Guyton AC, ur. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders/Elsevier; 2011, str.423-432.
- 4) McAdam A, Sharpe A. Infectious Diseases. U: Kumar V, Abbas A, Fausto N, ur. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Saunders; 2010, str. 331-398.
- 5) Wang XD, Soltesz V, Anderson R, Bengmark S. Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 per cent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 1993;80:66–71.
- 6) Parks RW, Clements WDB, Pope C i sur. Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J Anat* 1996;189:561–565.
- 7) Macfie J. Bacterial translocation in surgical patients. *Ann R Coll Surg Engl* 1997;79:183–189.
- 8) Macfie J, O’Boyle C, Mitchell CJ i sur. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223–228.
- 9) MacFie J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br Med Bull* 2004;71:1-11.
- 10) Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in the gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23:403.
- 11) Sedman PC, MacFie J, Sagar P i sur. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology* 1994;107, 643–649.

- 12) MacFie J, O'Boyle CJ, Mitchell CJ i sur. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999;45:223–228.
- 13) O'Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ i sur. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998;42: 29–35.
- 14) Saadia R, Schein M, MacFarlane C, Boffard KD. Gut barrier function and the surgeon. *Br J Surg* 1990;77:487–492.
- 15) Welsh FK, Ramsden CW, MacLennan K, Sheridan MB, Barklay GR, Guillou PJ. Increased intestinal permeability and altered mucosal jaundice. *Ann Surg* 1998;227:205–212.
- 16) Deitch EA. Nutrition and the gut mucosal barrier. *Curr Opin Gen Surg* 1993;85–91.
- 17) MacFie J, Reddy BS, Gatt M, Jain PK, Sowdi R, Mitchell CJ. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br J Surg* 2006;93(1):87–93
- 18) Nieuwenhuijs VB, Verheem A, Duijvenbode-Beumer H i sur. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth, and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 1998;228:188–93.
- 19) Deitch EA, Dazhong X, Naruhn MB, Deitch DC, Qi L, Marino AA. Elemental diet and iv-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria. *Ann Surg* 1995;221:299–307.
- 20) Bengmark S. Gut environment and immune function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999;2:83–85.
- 21) Naaber P, Smidt I, Tamme K i sur. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J Med Microbiol* 2000;49:431–439.
- 22) Runkel NSF, Moody FG, Smith GS i sur. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res* 1991;51:18–23.

- 23) Tran DD, Cuesta MA, van Leeuwen PA, Nauta JJ, Wesdorp RI. Risk factors for multiple organ system failure and death in critically injured patients. *Surgery* 1993;114:21–30.
- 24) Halsted WS. Circular suture of the intestine: an experimental study. *Am J Med Sci* 1887;94:436-61.
- 25) Nichols RL, Condon RE. Preoperative preparation of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1971;132:323–37.
- 26) Peppas G, Alexiou VG, Falagas ME. Bowel cleansing before bowel surgery: major discordance between evidence and practice. *J Gastrointest Surg* 2008;12(5):919-20.
- 27) Nichols RL, Condon RE. Preoperative preparation of the colon. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 132: 323–37
- 28) Chung RS, Gurll NJ, Berglund EM. A controlled trial of whole gut lavage as a method of bowel preparation for colonic operations. *Am J Surg* 1979;137:75–81.
- 29) Bengmark S. Synbiotic control of inflammation and infection in transplantation, *Transplantation Reviews* 2004;18:38–53.
- 30) Irving AD, Scrimgeour D. Mechanical bowel preparation for colonic resection and anastomosis. *Br J Surg* 1987;74:580–1.
- 31) Wille-Jørgensen P, Guenaga KF, Castro AA, Matos D. Clinical value of preoperative mechanical bowel cleansing in elective colorectal surgery: A systematic review. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1013-20.
- 32) Slim K, Vicaut E, Panis Y, Chipponi J. Meta-analysis of randomized clinical trials of colorectal surgery with or without mechanical bowel preparation. *Br J Surg* 2004;91(9):1125–1130.
- 33) Bucher P, Mermillod B, Gervaz P, Morel P. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery: a meta-analysis. *Arch Sur* 2004;139(12):1359–1364.

- 34) Wille-Jorgensen P, Guenaga KF, Matos D, Castro AA. Preoperative mechanical bowel cleansing or not? An updated metaanalysis. *Colorectal Dis* 2005;7(4):304–310.
- 35) Güenaga KF, Matos D, Wille-Jørgensen P. Mechanical bowel preparation for elective colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Sep 7;(9).
- 36) Zmora O, Wexner SD, Hajjar L, Park T, Efron JE, Nogueras JJ. Trends in preparation for colorectal surgery: survey of the members of the American Society of Colon and rectal surgeons. *Am Surg* 2003;69(2):150-4.
- 37) Roig JV, García-Fadrique A, García-Armengol J i sur. Mechanical bowel preparation and antibiotic prophylaxis in colorectal surgery: use by and opinions of Spanish surgeons. *Colorectal Dis* 2009;11(1):44-8.
- 38) Oremus K, Korolija D, Skegro M, Majerić-Kogler V, Tonković D, Silovski H. Fast track surgery-enhanced multimodal rehabilitation after surgery. *Lijec Vjesn* 2007;129(8-9):269-75.
- 39) Kiyono H, McGhee JR. T helper cells for mucosal immune responses. U: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, ur. *Handbook of mucosal immunology*. Orlando,Florida: Adademic Press;1994, str. 263-274.
- 40) Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R&D. *Tibtech* 1997;15:270-274.
- 41) Macpherson AJ, Uhr Th. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303:1662-1665.
- 42) Van der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 1989;43:69-87.
- 43) Bengmark S. Pre-, Pro-, Synbiotics and Human Health. *Food Technol Biotech* 2010;48 (4) 464 - 475.

- 44) Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal flora. U: Hentges DJ ur. Human intestinal microflora in health and disease. London: Academic Press;1983, str. 3-31.
- 45) Ahrné S, Nobaek S, Jeppsson B i sur. The normal Lactobacillus flora in healthy human rectal and oral mucosa. J Appl Microbiol 1998;85:88-94.
- 46) Adlerberth I, Carlsson B, deMan P i sur. Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. Acta Paediatr Scand 1991;80:602-610.
- 47) Sepp E, Julge K, Vasur M i sur. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. Acta Paediatrica 1997;86:956-961.
- 48) Lencner AA, Lencner CP, Mikelsaar ME i sur. Die quantitative Zusammensetzung der Lactoflora des Verdauungstrakts vor und nach kosmischen Flügen unterschiedlicher Dauer. Die Nahrung 1984;28:607-613.
- 49) Bengmark S. Bioecological control of inflammatory bowel disease. Clin Nutr. 2007;26(2):169-81.
- 50) Van der Waaij D, Berghuis-de Vries JM, Lekkerkerk V. Colonization resistance of the digestive tract and the spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. J Hyg 1972;70:335-342.
- 51) Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science 1965;147:747-748.
- 52) Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health 1974;29:4-8.
- 53) Fuller R. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 1989;66:365-378.
- 54) Havenaar R, Huis In't Veld JHJ. Probiotics: a general view. U: Wood BJB, ur. Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Vol 1. New York: Chapman and Hall;1992.

- 55) Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998;39:237–238.
- 56) Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001;73:361S–364S.
- 57) FAO/WHO report, October 2001
- 58) Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev* 2003;Mar;61(3):91-9.
- 59) Gomes AMP, Malcata FK. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci Tehnol* 1999;10:139-157.
- 60) Bengmark S. Synbiotics to strengthen gut barrier function and reduce morbidity in critically ill patients. *Clin Nutr* 2004;23:441-5.
- 61) Müller M, Lier D. Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria. *J Appl Bact* 1994;76:406-411.
- 62) Naaber P, Smidt I, Stsepetova J, Brilene T, Annuk H, Mikelsaar M. Inhibition of Clostridium difficile strains by intestinal Lactobacillus species. *Med Microbiol* 2004;53:551-554.
- 63) Tvede, M., and J. Rask-Madsen. Bacteriotherapy for chronic relapsing Clostridium difficile diarrhoea in six patients. *Lancet* 1989;1:1156-1160.
- 64) Roffe, C. 1996. Biotherapy for antibiotic-associated and other diarrhoeas. *J. Infect* 1996;32:1-10.
- 65) D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324:1361-1364.
- 66) Seehofer D, Rayes N, Schiller R i sur. Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats. *J Surg Res* 2004;117:262–271.

- 67) Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust* 2007;186(9):454-7.
- 68) Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. Probiotics: a general view. U: Wood BJB, ur. The lactic acid bacteria vol. 1. The lactic acid bacteria in health and disease. London: Chapman & Hall; 1992, str. 209–224.
- 69) Finegold SM, Sutter VL. Fecal flora in different populations, with special reference to diet. *Am. J. Clin. Nutr (Suppl.)* 1978;31:116–122.
- 70) Hipsley EH. Dietary “Fibre” and Pregnancy Toxaemia. *Br Med J* 1953;2(4833):420-2.
- 71) Trowell H. Crude fibre, dietary fibre, and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1972;16(1):138-40.
- 72) Trowell H. Ischemic heart disease and dietary fibre. *Am J Clin Nutr* 1972;Sep;25(9):926-32.
- 73) Burkitt DP, Walker ARP, Painter NS. Effect of dietary fibre on stools and transit times and its role in the causation of disease. *Lancet* 1972;2(7792):1408-12.
- 74) Trowell HC. Definition of dietary fibre. *Lancet*;1974:503.
- 75) Painter NS. Diverticular Disease of the Colon: A Deficiency Disease of Western civilization. London;Heinemann; 1975.
- 76) American Association of Cereal Chemists. The definition of dietary fiber: report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of directors of the American Association of Cereal Chemists. *Cereal Foods World* 2001;46:112–26.
- 77) Voudouris A, Kazamias P, Spyridaki E i sur. Benefits of Synbiotic 2000 forte in critically ill patients: a randomized controlled trial. *Critical Care* 2005;March9(S1):S152

- 78) Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Voudouris A, Kazamias P, Eleftheriadis E. Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial. *World J Surg* 2006;30:1848-55.
- 79) Spindler-Vesel A, Bengmark S, Vovk I, Cerovic O, Kompan L. Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2007;31(2):119-26.
- 80) Oláh A, Belágyi T, Pótó L, Romics L Jr, Bengmark S. Synbiotic control of inflammation and infection in severe acute pancreatitis: a prospective, randomized, double blind study. *Hepatogastroenterology* 2007;54(74):590-4.
- 81) Chermesh I, Tamir A, Reshef R i sur. Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2007;52(2):385-9.
- 82) Knight DJ, Gardiner D, Banks i sur. Effect of synbiotic therapy on the incidence of ventilator associated pneumonia in critically ill patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Intensive Care Med* 2009;35(5):854-61.
- 83) Perkins AJ. Acute and Chronic Inflammation U: Kumar V Abbas A Fausto N, ur. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Saunders; 2010, str. 331-398.
- 84) Nelson RL, Glenny AM, Song F. Antimicrobial prophylaxis for colorectal surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;Jan 21;(1).
- 85) Song F, Glenny AM. Antimicrobial prophylaxis in colorectal surgery: a systematic review of randomized controlled trials. *Br J Surg* 1998;85(9):1232-41.
- 86) Han-Geurts IJ, Hop WC, Kok NF, Lim A, Brouwer KJ, Jeekel J. Randomized clinical trial of the impact of early enteral feeding on postoperative ileus and recovery. *Br J Surg* 2007;94(5):555-61.

- 87) Charoenkwan K, Phillipson G, Vutyavanich T. Early versus delayed (traditional) oral fluids and food for reducing complications after major abdominal gynaecologic surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;Oct 17;(4).
- 88) Ljungh L, Lan J-G, Yamagisawa N. Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* isolate F19. *Microbial Ecology in Health and Disease*, Volume 14, Supplement 3, 2002;4-6(3).
- 89) Kruszewska K, Lan J, Lorca G i sur. Selection of lactic acid bacteria as probiotic strains by in vitro tests. *Microecology and Therapy*. 2002;29:37-51.
- 90) Anderson AD, McNaught CE, Jain PK, MacFie J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. *Gut* 2004;53:241–5.
- 91) Rayes N, Seehofer D, Neuhaus P. Prebiotics, probiotics, synbiotics in surgery: are they only trendy, truly effective or even dangerous? *Langenbecks Arch Surg* 2009;394(3):547-55.
- 92) Tanaka K, Yano M, Motoori M i sur. Impact of perioperative administration of synbiotics in patients with esophageal cancer undergoing esophagectomy: A prospective randomized controlled trial. *Surgery* 2012;152(5):832-42.
- 93) Van Santvoort HC, Besslink MG, Timmerman HM, Van Minnen LP, Ahhermans LM, Gooszen HG. Probiotics in surgery. *Surgery* 2008;143:1-7.
- 94) Kinross JM, Markar S, Karthikesalingam A i sur. A meta-analysis of probiotic and synbiotic use in elective surgery: does nutrition modulation of the gut microbiome improve clinical outcome? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013;37(2):243-53.
- 95) Rayes N, Hansen S, Seehofer D i sur. Early enteral supply of fiber and *Lactobacilli* versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 2002;18(7-8):609-15.

- 96) Rayes N, Seehofer D, Hansen S i sur. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002;15;74(1):123-7.
- 97) McNaught CE, Woodcock NP, MacFie J, Mitchell CJ. A prospective randomised study of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut* 2002;51(6):827-31.
- 98) Woodcock NP, McNaught CE, Morgan DR, Gregg KL, MacFie J. An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. *Clin Nutr* 2004;23(5):1069-73.
- 99) Rayes N, Seehofer D, Theruvath T i sur. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial. *Am J Transplant* 2005;5(1):125-30.
- 100) Kanazawa H, Nagino M, Kamiya S i sur. Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2005;390(2):104-13.
- 101) Sugawara G, Nagino M, Nishio H i sur. Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. *Ann Surg* 2006;244(5):706-14.
- 102) Reddy BS, Macfie J, Gatt M, Larsen CN, Jensen SS, Leser TD. Randomized clinical trial of effect of synbiotics, neomycin and mechanical bowel preparation on intestinal barrier function in patients undergoing colectomy. *Br J Surg* 2007;94(5):546-54.
- 103) Rayes N, Seehofer D, Theruvath T i sur. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: a randomized, double-blind trial. *Ann Surg* 2007;246(1):36-41.

- 104)Nomura T, Tsuchiya Y, Nashimoto A i sur. Probiotics reduce infectious complications after pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 2007;54(75):661-3.
- 105)Woodard GA, Encarnacion B, Downey JR i sur. Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Gastrointest Surg* 2009;13(7):1198-204.
- 106)Gianotti L, Morelli L, Galbiati F i sur. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2010;16(2):167-75.
- 107)Liu Z, Qin H, Yang Z i sur. Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery - a double-blind study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33(1):50-63.
- 108)Diepenhorst GM, van Ruler O, Besselink MG i sur. Influence of prophylactic probiotics and selective decontamination on bacterial translocation in patients undergoing pancreatic surgery: a randomized controlled trial. *Shock*. 2011;35(1):9-16.
- 109)Eguchi S, Takatsuki M, Hidaka M, Soyama A, Ichikawa T, Kanematsu T. Perioperative synbiotic treatment to prevent infectious complications in patients after elective living donor liver transplantation: a prospective randomized study. *Am J Surg*. 2011;201(4):498-502.

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 4. svibnja 1966. od oca Hrvata i mame Slovenke u Šempetru kod Gorice. Osnovnu i srednju školu pohađao sam u Mariboru. 1985. godine, po odsluženju vojnog roka, upisao sam studij medicine na Medicinskom fakultetu u Ljubljani. Godine 1992. sam diplomirao. Pripravnički staž završio sam u Općoj bolnici Maribor. Po završetku staža započeo sam specijalizaciju iz ginekologije, koju sam nakon dvije godine prekinuo i započeo specijalizaciju iz kirurgije.

Za vrijeme specijalizacije upisao sam dodiplomski znanstveni studij «Ultrazvuk u gastroenterologiji» na Sveučilištu u Zagrebu i položio prva dva semestra.

1999. godine sam položio specijalistički ispit iz Opće kirurgije te se redovito zaposlio na Odjelu za abdominalnu i opću kirurgiju Opće bolnice Maribor.

U godini 2001. sam na godinu dana prekinuo radni staž u Općoj bolnici Maribor. Naime, te sam godine privremeno radio kao kirurg u prvoj privatnoj kirurškoj klinici u Sloveniji - Kirurškom sanatoriju Rožna dolina.

Od 2002. sam ponovno na Odjelu za abdominalnu i opću kirurgiju Opće bolnice Maribor gdje radim na odsjeku koji se bavi prije svega kirurgijom kolona i rektuma i laparoskopijom.

U školskoj godini 2004./2005. nastavio sam svoj dodiplomski studij, koji je u tom vremenu preimenovan u doktorski postdiplomski studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu.

Odslušao sam sva predavanja i položio sve ispite.

2005., 2007. i 2012. bio sam izabran za naziv asistenta na području kirurgije na Medicinskom fakultetu u Mariboru. Držim predavanja na Medicinskom fakultetu u Mariboru i sudjelujem na vježbama predmeta: Anatomija, Prva pomoć, Učenje na temelju problema(PBL) i Kirurgija.

Sudjelovao sam na više kirurških škola i radionica u Sloveniji i inozemstvu. Posebna mi je čast, da sam bio gost prof. Healda u Basingstoku, gdje sam dopunjavao svoje znanje na području totalne mezorektalne ekscizije(TME) karcinoma rektuma.

Kao prvi autor i koautor objavio sam više stručnih članaka u domaćim i stranim časopisima, a kao predavač sudjelovao sam na raznim domaćim i stranim skupovima.